

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
30. August 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/62960 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/00747

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Februar 2001 (23.02.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 10 282.4 25. Februar 2000 (25.02.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,  
10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OLEK, Alexan-  
der [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE).  
BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532  
Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, 10119  
Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING CYTOSINE METHYLATION IN DNA SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION VON CYTOSIN-METHYLIERUNG IN DNA PROBEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting 5-methylcytosine in genomic DNA samples. Firstly, a genomic DNA from a DNA sample is chemically reacted with a reagent, whereby 5-methylcytosine and cytosine react differently. Afterwards, the pretreated DNA is amplified while using a polymerase and at least one primer. In the next step, the amplified genomic DNA is hybridized to at least one oligonucleotide while forming a duplex, and the same is lengthened by at least one nucleotide, whereby the nucleotide carries a detectable tagging, and the lengthening is subject to the methylation status of the respective cytosine in the genomic DNA sample. In the following step, the lengthened oligonucleotides are examined for the presence of the tagging.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben. Zuerst wird eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren, und anschliessend wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Primer amplifiziert. Im nächsten Schritt wird die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert und selbiges um mindestens ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt. Im nächsten Schritt werden die verlängerten Oligonukleotide auf das Vorhandensein der Markierung untersucht.

WO 01/62960 A2

## **Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in DNA Proben**

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar.

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Detektion des Methylierungszustandes genomischer DNA Proben. Das Verfahren kann gleichzeitig auch zum Nachweis von Punktmutationen und Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) genutzt werden.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlererweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnik, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden  
5 kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“, (Gonzalzo, M. L. und Jones,  
10 P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 9928498).

15 Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalzo, M. L. und Jones, P.  
20 A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnik, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261; WO 9746705 und WO 9515373.

25 Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich aus einer im Januar 1999 erschienen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der dort  
30 zitierten Literatur entnehmen.

Es existieren verschiedene Verfahren um DNA zu immobilisieren. Das bekannteste Verfahren ist die Festbindung einer DNA, welche mit Biotin funktionalisiert ist, an eine  
35 Streptavidin-beschichtete Oberfläche (Uhlen, M. et al. 1988, Nucleic Acids Res. 16, 3025-3038). Die Bindungs-

stärke dieses Systems entspricht der einer kovalenten chemischen Bindung ohne eine zu sein. Um eine Ziel-DNA kovalent an eine chemisch vorbereitete Oberfläche binden zu können, bedarf es einer entsprechenden Funktionalität der Ziel-DNA. DNA selbst besitzt keine Funktionalisierung, die geeignet ist. Es gibt verschiedene Varianten, in eine Ziel-DNA eine geeignete Funktionalisierung einzuführen: Zwei leicht zu handhabende Funktionalisierungen sind primäre, aliphatische Amine und Thiole. Solche Amine werden quantitativ mit N-Hydroxysuccinimidestern umgesetzt, und Thiole reagieren unter geeigneten Bedingungen quantitativ mit Alkyljodiden. Eine Schwierigkeit besteht im Einführen einer solchen Funktionalisierung in eine DNA. Die einfachste Variante ist die Einführung durch einen Primer einer PCR. Gezeigte Varianten benutzen 5'-modifizierte Primer ( $\text{NH}_2$  und SH) und einen bifunktionalen Linker.

Ein wesentlicher Bestandteil der Immobilisierung auf einer Oberfläche ist ihre Beschaffenheit. Bis jetzt beschriebene Systeme sind hauptsächlich aus Silizium oder Metall. Eine weitere Methode zur Bindung einer Ziel-DNA basiert darauf, eine kurze Erkennungssequenz (z. B. 20 Basen) in der Ziel-DNA zur Hybridisierung an ein oberflächenimmobilisiertes Oligonukleotid zu verwenden. Es sind auch enzymatische Varianten zur Einführung von chemisch aktivierten Positionen an eine Ziel-DNA beschrieben worden. Hier wird an einer Ziel-DNA enzymatisch eine 5'- $\text{NH}_2$ -Funktionalisierung durchgeführt.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein

Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Neuere Verfahren zum Nachweis von Mutationen sind im folgenden aufgeführt:

5 Als ein Spezialfall der Sequenzierung ist die Einzelbasen-Primer-Erweiterung (Genetic Bit Analysis) erwähnenswert (Head, SR., Rogers, YH., Parikh K., Lan, G., Anderson, S., Goelet, P., Boycejacino MT., Nucleic Acids Research. 25(24): 5065-5071, 1997; Picoult-Newberg, L., Genome Res. 9(2): 167-174, 1999). Eine kombinierte Amplifikation und Sequenzierung wird in US-A1 5928906 beschrieben, wo eine basenspezifische Terminierung auf Matrixmolekülen eingesetzt wird. Ein weiteres Verfahren setzt eine Ligase/Polymerasereaktion für die Identifikation von  
10 Nukleotiden ein (US-A1 5952174).  
15

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI) ist eine sehr leistungsfähige  
20 Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen  
25 Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen  
30 Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

Maldi eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas  
35 schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectro-

metry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nucleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab.

5 Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. Für MALDI spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices

10 gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlerereweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die

15 gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungsschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA

20 alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die Kopplung eines „charge tags“, an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er

25 für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“, ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

30 Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Gemeinsamkeiten zwischen Promotoren bestehen nicht nur im Vorkommen von TATA- oder GC-Boxen sondern auch darin, für welche Transkriptionsfaktoren sie Bindestellen besitzen und in welchem Abstand diese sich zueinander befinden.

- 5 Die existierenden Bindestellen für ein bestimmtes Protein stimmen in ihrer Sequenz nicht vollständig überein, es finden sich aber konservierte Folgen von mindestens 4 Basen, die durch das Einfügen von „Wobbles“, d. h. Positionen, an denen sich jeweils unterschiedliche Basen befinden, noch verlängert werden können. Des weiteren liegen  
10 diese Bindestellen in bestimmten Abständen zueinander vor.

- Die Verteilung der DNA im Interphase-Chromatin, das den  
15 größten Teil des nuklearen Volumens einnimmt, unterliegt jedoch einer ganz speziellen Ordnung. So ist die DNA an mehreren Stellen an die nukleare Matrix, eine filamentöse Struktur an der Innenseite der nuklearen Membran, angeheftet. Diese Regionen bezeichnet man als matrix attachment regions (MAR) oder scaffold attachment regions  
20 (SAR). Das Anheften hat wesentlichen Einfluß auf die Transkription bzw. die Replikation. Diese MAR-Fragmente weisen keine konservativen Sequenzen auf, bestehen allerdings zu 70% aus A bzw. T und liegen in der Nähe von cisagierenden Regionen, die die Transkription allgemein regulieren, und Topoisomerase II-Erkennungsstellen.  
25

- Neben Promotoren und Enhancern existieren weitere regulatorische Elemente für verschiedene Gene, sogenannte Insulators. Diese Insulators können z.B. die Wirkung des Enhancers auf den Promotor inhibieren, wenn sie zwischen  
30 Enhancer und Promotor liegen, oder aber, zwischen Heterochromatin und einem Gen gelegen, das aktive Gen vor dem Einfluß des Heterochromatins schützen. Beispiele für solche Insulators sind: 1. sogenannte LCR (locus control regions), welche aus mehreren gegenüber DNAase I hypersen-  
35



sitiven Stellen besteht; 2. bestimmte Sequenzen wie SCS (specialized chromatin structures) bzw. SCS', 350 bzw. 200 bp lang und hoch-resistent gegen Degradierung durch DNAase I und auf beiden Seiten von hypersensitiven Stellen flankiert (Abstand je 100 bp). An scs' bindet das Protein BEAF-32. Diese Insulators können auf beiden Seiten des Gens liegen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es ein Verfahren bereitzustellen, welches sich zum gleichzeitigen Detektieren von Cytosin-Methylierungen und SNPs in genomischen DNA-Proben besonders eignet. Dabei soll bevorzugt eine Vielzahl von Fragmenten gleichzeitig untersucht werden können.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben gelöst, wobei man die folgenden Schritte ausführt:

- (a) man setzt eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen;
- (b) man amplifiziert vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Oligonukleotid (Typ A) als Primer;
- (c) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid (Typ B) mit bekannter Sequenz von n Nucleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide des Typs B mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- (d) man verlängert das Oligonukleotid (Typ B), sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an der zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels ei-

ner Polymerase mindestens um ein Nukleotid, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;

- 5 (e) man untersucht die verlängerten Oligonukleotide werden auf das Vorhandensein der Markierung.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die Oligonukleotide (Typ B) an definierten Stellen an eine Festphase bindet oder dass man die Amplifikate an definierten Stellen an eine Festphase bindet.

Bevorzugt ist es ferner, dass man unterschiedliche Oligonukleotidsequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters anordnet.

Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

Bevorzugt ist auch, dass die an den verlängerten Oligonukleotiden angebrachten Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass bei der Amplifikation mindestens ein Primer (Typ A) an eine Festphase gebunden ist.

Außerdem kann es erfindungsgemäß bevorzugt sein, dass man unterschiedliche Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters anordnet.

Ganz besonders bevorzugt ist es, dass man die Behandlung der DNA vor der Amplifikation mit einer Bisulfitlösung (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt.

- 5      Insbesondere ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgt.

- 10      Es ist ferner erfindungsgemäß besonders bevorzugt dass die verwendeten Oligonukleotide des Typs A entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.

- 15      Bevorzugt ist es ferner, dass die Markierungen der Nukleotide Fluoreszenzmarkierungen sind.

Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Markierungen der Nukleotide Radionuklide sind.

- 20      Besonders bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Nukleotide ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

- 25      Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die verlängerten Oligonukleotide insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig markiert sind. Besonders bevorzugt ist es auch, dass man jeweils ein Fragment der verlängerten Oligonukleotide im Massenspektrometer nachweist.

- 30      Es ist weiterhin erfindungsgemäß bevorzugt, dass man das Fragment des verlängerten Oligonukleotids durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt.

- 35      Erfindungsgemäß bevorzugt ist es ferner, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten

Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

5 Ganz besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Detektion der verlängerten Oligonukleotide mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.

10 Es ist weiterhin erfindungsgemäß ein Verfahren bevorzugt, wobei die Polymerasen hitzebeständige DNA-Polymerasen sind.

15 Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch ein Verfahren, wobei man zusätzlich zur DNA-Methylierung auch SNPs detektiert und visualisiert.

20 Es ist ferner ein Verfahren bevorzugt, wobei die eingesetzten Nukleotide terminierende (Typ C 2) und/oder kettenverlängernde Nukleotide (Typ C 1) sind.

25 Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner ein Verfahren, wobei man die Nukleotide (Typ C 1 und C2) aus einer Gruppe auswählt, die entweder die Nukleobasen A, T und C oder aber die Basen G und A und T enthält.

Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt.

30

35 Ganz besonders ist ein Verfahren erfindungsgemäß bevorzugt, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.

Schließlich ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man Methylierungsanalysen des oberen und unteren DNA-Stranges in einem Experiment durchführt. Die Durchführung der Analysen erfolgt bevorzugt gleichzeitig.

Beschrieben wird also ein Verfahren zum Nachweis von Methylcytosin in genomischen DNA-Proben:

Die Methode beinhaltet die Amplifikation, Hybridisierung und Verlängerungsreaktion einer gesamten DNA oder eines Fragments hiervon. Die Methode kann benutzt werden zum Nachweis von Methylcytosin und auch gleichzeitig von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) und Mutationen.

Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

Im ersten Schritt des Verfahrens wird die eingesetzte DNA bevorzugt mit Bisulfit, (= Disulfit, Hydrogensulfit) oder aber einer anderen Chemikalie derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosinbasen so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Die anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil.

Im zweiten Schritt des Verfahrens wird die vorbehandelte DNA bevorzugt unter Verwendung einer hitzebeständigen Polymerase und mindestens einem Primer (Typ A) amplifiziert.

5

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Amplifikation mit Primern des Typs A mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt.

10 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Amplifikation von mehreren DNA-Fragmenten in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Dies kann entweder eine sogenannte Multiplex PCR sein, in der verschiedene Primer jeweils definierte Fragmente erzeugen. Es werden verschiedene definierte Amplifikationen in einem Reaktionsgefäß  
15 durchgeführt. In einer weiteren, besonders bevorzugten Variante des Verfahrens amplifizieren Primer gezielt und reproduzierbar jeweils mehrere Fragmente. Dies kann entweder dadurch erzielt werden, dass sie beispielsweise an repetitive Elemente im Genom binden. In einer besonders  
20 bevorzugten Variante des Verfahrens binden die Primer an Transcription Factor Binding Sites, an Promotoren oder andere regulatorische Elemente in Genen. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens findet die  
25 Amplifikation durch Verlängerung von Primern statt, die an eine Festphase gebunden sind. Eine Multiplex-PCR im weiteren Sinne kann dadurch ausgeführt werden, dass unterschiedliche Primer an verschiedenen, definierten Orten einer Festphase gebunden sind.

30

In einer wiederum bevorzugten Variante des zweiten Verfahrensschrittes ist die Festphase eben, wobei die unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind. Das  
35 hat zur Folge, dass auch die unterschiedlichen Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder

hexagonalen Gitters angeordnet sind. Wie bereits oben beschrieben, werden in diesem Fall mehrere Amplifikate direkt auf der Festphase erzeugt.

- 5 Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

- 10 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens enthalten die Oligonukleotide des Typs A entweder nur die Basen T, A und C oder nur die Basen T, A und G.

- 15 Im dritten Verfahrensschritt wird die amplifizierte genomische DNA an mindestens einen Primer (Typ B) unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert. Die hybridisierten Oligonukleotide des Typs B binden jeweils an ihrem 3'-Ende an die Positionen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind. Dabei können zwei Fälle unterschieden werden: entweder ist die zu
- 20 untersuchende Sequenz zu dem Primer auch an seinem 3'-Ende vollständig komplementär, in diesem Fall ist eine Verlängerung des Primers im nächsten Schritt in einer Polymerasereaktion möglich, oder aber die Sequenz ist zu der des Primers am 3'-Ende nicht vollständig komplementär, in diesem Fall kann keine Verlängerung des Primers
- 25 erfolgen. Ist eine bestimmte CpG Position auf Methylierung hin zu untersuchen, so gibt es zwei mögliche Zustände. Nach der chemischen Vorbehandlung, bevorzugt mit Bisulfit, ergibt sich bei Methylierung ein CG, bei Vorliegen eines unmethylierten Cytosins ein UG bzw. nach der
- 30 Amplifikation ein TG. Bevorzugt wird das Experiment in diesem Fall mit zwei unterschiedlichen Primern durchgeführt, die jeweils für einen der Zustände eine vollständige Komplementarität und damit die Möglichkeit zur Kettenverlängerung in jeweils einem der beiden möglichen
- 35 Fälle ergeben.

Sind nicht bereits die Amplifikate an eine Festphase gebunden, so können die an die Amplifikate hybridisierten Oligonukleotide mit ihrem 5'-Ende oder an einer anderen  
5 Base oder über ihr Rückgrat mit einer Festphase verbunden sein, nicht aber über ihr 3'-Ende. Bevorzugt erfolgt eine Bindung über das 5'-Ende. In einer bevorzugten Variante ist die Festphase eben, wobei die unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen (Typ B) in Form eines rechtwinkligen  
10 oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

15

Im vierten Verfahrensschritt wird das entstandene Oligonukleotid mit einer hitzebeständigen Polymerase um mindestens ein bis maximal zehn Nukleotide verlängert, wobei zumindest ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung  
20 trägt. Die Art der Verlängerung hängt dabei vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe ab, oder aber auch von eventuell vorhandenen SNPs, Punktmutationen oder Deletionen, Insertionen und Inversionen.

25

Prinzipiell sind nur terminierende Oligonukleotide (Typ C2) erforderlich. Je nach Sequenz können jedoch auch kettenverlängernde Oligonukleotide verwendet werden, sofern es im jeweiligen Sequenzkontext möglich ist.

30

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens sind die eingesetzten Nukleotide terminierende (Typ C2) und/oder kettenverlängernde Nukleotide (Typ C1). In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Nukleobasen des Typs C1 und/oder des Typs C2 aus einer  
35



Gruppe ausgewählt, die die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthält.

Die Markierung der verlängerten Oligonukleotide des Typs  
5 B erfolgt bevorzugt über absorbierende Farbstoffe  
und/oder über Chemilumineszenz und/oder über radioaktive  
Isotope und/oder über Fluoreszenzmarkierungen, die über  
die im vierten Verfahrensschritt angefügten Nukleotide  
eingeführt werden. Bevorzugt ist ebenfalls die Markierung  
10 über die Molekülmasse des verlängerten Oligonukleotids.  
Vorzugsweise wird der Fluoreszenzmarker durch ein fluo-  
reszenzmarkiertes Nukleotid wie z. B. Cy5-dCTP einge-  
führt.

15 Im fünften Verfahrensschritt werden die verlängerten Oli-  
gonukleotide auf das Vorhandensein einer Markierung un-  
tersucht. Wird eine ebene Festphase verwendet, so erfolgt  
eine Analyse an jedem Ort auf der Festphase, an dem ur-  
sprünglich ein Oligonukleotid immobilisiert wurde.

20 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens  
erfolgt der Nachweis der verlängerten Oligonukleotide ü-  
ber ihre Fluoreszenz.

25 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens werden Frag-  
mente des verlängerten Oligonukleotids durch Verdau mit  
einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens  
30 sind die Markierungen der Nukleotide ablösbare Massenmar-  
kierungen, die in einem Massenspektrometer nachweisbar  
sind.

Ablösbare Massenmarkierungen, die verlängerten Oligo-  
35 nukleotide insgesamt oder Fragmente hiervon werden in ei-  
ner besonders bevorzugten Variante des Verfahrens mittels

Matrix-assistierter Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) oder mittels Elektronenspray-Massenspektrometrie (ESI) anhand ihrer eindeutigen Masse nachgewiesen und visualisiert.

5

Vorzugsweise weisen die im Massenspektrometer detektierten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung auf.

- 10 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) und Cytosin-Methylierungen in einem Experiment analysiert.

- 15 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden der untere und der obere Strang der DNA-Probe nach der chemischen Vorbehandlung in einem Experiment analysiert, um eine interne experimentelle Kontrolle sicherzustellen.

- 20 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit, das Chemikalien und Hilfsmittel zur Durchführung der Bisulfit-Reaktion und/oder der Amplifikation, der Hybridisierung, der Verlängerungsreaktion und/oder Polymerasen und/oder die Dokumentation zur Durchführung des Verfahrens ent-
- 25 hält.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

- 30 Beispiel 1:

Das folgende Beispiel bezieht sich auf ein Fragment von Exon 23 des Faktor VIII-Gens, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung zu untersuchen ist.

- 35 Im ersten Schritt wird das Fragment durch Primer des Typs A amplifiziert und zwar durch

- ATTATGTTGGAGTAGTAGAGTTTAAATGGTT (SEQ-ID No.: 1) und  
ACTTAACACTTACTATTTAAATCACAACCCAT (SEQ-ID No.: 2). Die  
amplifizierte DNA wird an ein Oligonukleotid des Typs B  
(beispielsweise GTTGGATGTTGTTGAGAAACG (SEQ-ID No.: 3))  
5 hybridisiert und in einer Polymerasereaktion mit einem  
markierten 2',3'-Didesoxythymidintriphosphat (Typ C2)  
verlängert. Nur wenn ein CG, das heißt in der ursprüngli-  
chen genomischen DNA-Probe ein methyliertes Cytosin vor-  
gelegen hat, kann diese Verlängerung erfolgen, da sonst  
10 eine Fehlpaarung am 3'-Ende des Primers die Polymerase-  
reaktion verhindert. Somit entscheidet der Methylie-  
rungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins ü-  
ber die Verlängerung des Primers.
- 15 Zur Kontrolle kann die Reaktion mit dem Primer  
GTTGGATGTTGTTGAGAAATG (SEQ-ID No.: 4) durchgeführt wer-  
den. In diesem Fall findet die Verlängerung nur dann  
statt, wenn in der zu untersuchenden DNA-Probe an besag-  
ter Position ein unmethyliertes Cytosin vorgelegen hat.  
20 Die Label können beispielsweise absorbierende Farbstoffe  
wie Megaprime™ für ddTTP oder Rediprime II™ sein.

#### Beispiel 2:

- 25 Das folgende Beispiel bezieht sich auf ein Fragment von  
Exon 23 des Faktor VIII-Gens, in dem eine bestimmte CG-  
Position auf Methylierung zu untersuchen ist.

- Im ersten Schritt wird das Fragment durch Primer des Typs  
30 A amplifiziert und zwar durch  
ATTATGTTGGAGTAGTAGAGTTTAAATGGTT (SEQ-ID No.: 1) und  
ACTTAACACTTACTATTTAAATCACAACCCAT (SEQ-ID No.: 2). Die  
amplifizierte DNA wird an ein Oligonukleotid des Typs B  
(beispielsweise GTTGGATGTTGTTGAGAAACG (SEQ-ID No.: 3))

hybridisiert, das mit seinem 5'-Ende an eine Festphasen-  
oberfläche immobilisiert ist, und in einer Polymerase-  
reaktion mit einem markierten 2',3'-

5 Didesoxythymidintriphosphat (Typ C2) verlängert. Nur wenn  
ein CG, das heißt in der ursprünglichen genomischen DNA-  
Probe ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kann diese  
Verlängerung erfolgen, da sonst eine Fehlpaarung am 3'-  
Ende des Primers die Polymerasereaktion verhindert. Somit  
entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu un-  
10 tersuchenden Cytosins über die Verlängerung des Primers.

Zur Kontrolle kann die Reaktion mit dem Primer  
GTTGGATGTTGTTGAGAAATG (SEQ-ID No.: 4) durchgeführt wer-  
den. In diesem Fall findet die Verlängerung nur dann  
15 statt, wenn in der zu untersuchenden DNA-Probe an besag-  
ter Position ein unmethyliertes Cytosin vorgelegen hat.  
Die Label können beispielsweise absorbierende Farbstoffe  
wie Megaprime™ für ddTTP oder Rediprime II™ sein.

20

### Beispiel 3:

Das folgende Beispiel bezieht sich auf ein Fragment von  
Exon 23 des Faktor VIII-Gens, in dem eine bestimmte CG-  
Position auf Methylierung zu untersuchen ist.

25

Im ersten Schritt wird das Fragment durch Primer des Typs  
A amplifiziert und zwar durch  
ATTATGTTGGAGTAGTAGAGTTTAAATGGTT (SEQ-ID No.: 1) und  
ACTTAACACTTACTATTTAAATCACAACCCAT (SEQ-ID No.: 2). Für  
30 diese Amplifikation wurde mit Bisulphit behandelte DNA  
für 5 min bei 96 °C inkubiert und dann in 40 Zyklen je-  
weils 55 sec bei 96 °C denaturiert, 75 sec bei 61.7 °C  
inkubiert (Annealing) und 100 sec bei 72 °C inkubiert (E-  
longation). In einer anschließenden Reaktion (final Ex-

tension) wird der Reaktionsansatz 15 min bei 72 °C inkubiert. Die amplifizierte DNA wird an die Oligonukleotide AAAA ACTACAAAA ACTCT (SEQ-ID No.: 5) (Spot 1 in Fig. 1) und AAAA ACTACGAAAA ACTCT (SEQ-ID No.: 6) (Spot 2 in Fig. 1) hybridisiert, die an einer festen Phase immobilisiert sind. Für die Verlängerungsreaktion wird 2'-Desoxythymidintriphosphat (dTTP, als Typ C1), 2'-Desoxyguanosintriphosphat (dGTP, als Typ C1), 2'-Desoxyadenosintriphosphat (dATP, als Typ C1) und 2'-Desoxycytidintriphosphat (dCTP, als Typ C1) benötigt, wobei zusätzlich fluoreszenzmarkiertes 2'-Desoxycytidintriphosphat im Verhältnis von 3:1 (bezogen auf nicht markiertes 2'-Desoxycytidintriphosphat) zugegeben wird. Der Reaktionsansatz, bestehend aus dem Amplifikat, dem Desoxynukleotidgemisch und 10xPuffer, wird für 15 min bei 96 °C inkubiert. Für die anschließende Primer-Extension-Reaktion wird eine DNA-Polymerase, hier Klenow Fragment, zugesetzt und das Reaktionsgemisch über Nacht bei 37 °C auf der festen Phase inkubiert. Wie in der folgenden Abbildung zu erkennen, läßt die durchgeführte Primer Extension auf den Methylierungsstatus der DNA schließen. Ein Vergleich von Spot 1 und Spot 2, wie in Fig. 1 dargestellt, erlaubt eine Aussage über den Methylierungsstatus: im vorliegenden Fall wird durch die Stärke des Signals von Spot 1 ein nicht methyliertes CpG nachgewiesen.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben, dadurch gekennzeichnet, dass man die folgenden Schritte ausführt:
- (a) man setzt eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen;
- (b) man amplifiziert vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Oligonukleotid (Typ A) als Primer;
- (c) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid (Typ B) mit bekannter Sequenz von n Nucleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide des Typs B mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- (d) man verlängert das Oligonukleotid (Typ B), sofern es mit seinem 3'Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an der zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;

(e) man untersucht die verlängerten Oligonukleotide werden auf das Vorhandensein der Markierung.

- 5       2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass man die Oligonukleotide (Typ B) an definierten  
Stellen an eine Festphase bindet.
- 10       3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass man die Amplifikate an definierten Stellen an  
eine Festphase bindet.
- 15       4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,  
dass man unterschiedliche Oligonukleotidsequenzen auf  
einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen  
oder hexagonalen Gitters anordnet.
- 20       5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch  
gekennzeichnet, dass die Festphasenoberfläche aus Si-  
lizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen,  
Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.
- 25       6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch  
gekennzeichnet, dass die an den verlängerten Oligo-  
nukleotiden angebrachten Markierungen an jeder Posi-  
tion der Festphase, an der sich eine Oligonukleotid-  
sequenz befindet, identifizierbar sind.
- 30       7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass bei der Amplifikation mindestens ein Primer (Typ  
A) an eine Festphase gebunden ist.
- 35       8. Verfahren nach Anspruch 1, 3 oder 7, dadurch gekenn-  
zeichnet, dass man unterschiedliche Amplifikate auf  
der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexa-  
gonalen Gitters anordnet.

- 5
9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Behandlung der DNA vor der Amplifikation mit einer Bisulfitlösung (=Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt.
- 10
10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgt.
- 15
11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in Anspruch 1 verwendeten Oligonukleotide des Typs A entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.
- 20
12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Nukleotide Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 25
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Nukleotide Radionuklide sind.
- 30
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Nukleotide ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 35
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man die verlängerten Oligonukleotide insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig markiert sind.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man jeweils ein Fragment der



verlängerten Oligonukleotide im Massenspektrometer nachweist.

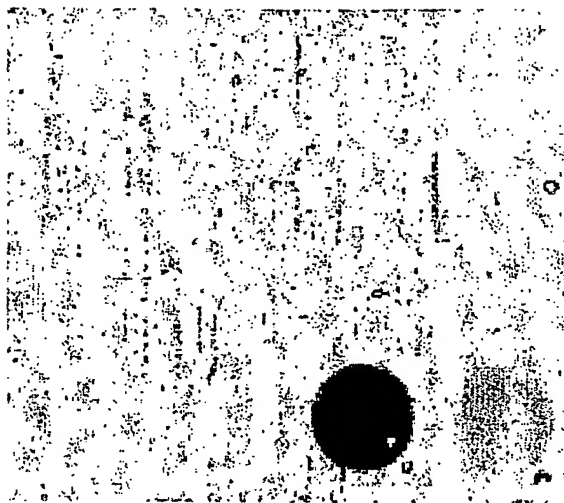
- 5 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man das Fragment des verlängerten Oligonukleotids durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt.
- 10 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.
- 15 19. Verfahren gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Detektion der verlängerten Oligonukleotide mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.
- 20 20. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die Polymerasen hitzebeständige DNA-Polymerasen sind.
- 25 21. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei man zusätzlich zur DNA-Methylierung auch SNPs detektiert und visualisiert.
- 30 22. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die eingesetzten Nukleotide terminierende (Typ C 2) und/oder kettenverlängernde Nukleotide (Typ C 1) sind.
- 35 23. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei man die Nukleotide (Typ C 1 und C2) aus einer

Gruppe auswählt, die entweder die Nukleobasen A, T und C oder aber die Basen G und A und T enthält.

- 5           24. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt.
- 10           25. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.
- 15           26. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man Methylierungsanalysen des oberen und unteren DNA-Stranges in einem Experiment gleichzeitig durchführt.

20

***Fig. 1***



Spot 1 Spot 2

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Epigenomics AG

5     <120> Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in  
DNA-Proben

<130> E01-1179-WO

10    <140>  
<141>

<160> 6

15    <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 31  
<212> DNA

20    <213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Oligonukleotid

25    <400> 1  
attatgttgg agtagtagag tttaaattgt t 31

<210> 2

30    <211> 32  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

35    <223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 2  
acttaacact tactatttaa atcacaaccc at 32

5 <210> 3  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 3  
15 gttggatggt gttgagaaac g 21

<210> 4  
<211> 21  
<212> DNA  
20 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Oligonukleotid

25 <400> 4  
gttggatggt gttgagaaat g 21

<210> 5  
30 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
35 <223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 5  
aaaaactaca aaaactct 18

5 <210> 6  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Oligonukleotid

<400> 6  
15 aaaaaactacg aaaactct 18